



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА”
КАТЕДРА ПО ОНКОЛОГИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

на

Д-Р ЖЕЛЯЗКО ИЛИЕВ АРАБАДЖИЕВ

**ПРЕДИКТИВНА И ПРОГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ
НА ТУМОР-ИНФИЛТРИРАЩИТЕ ЛИМФОЦИТИ
ПРИ ЖЕНИ С РАК НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗА**

Научна специалност: Онкология

Научен ръководител: Доц. д-р Елеонора Димитрова-Господинова, д.м.

Официални рецензенти: Доц. д-р Николай Цонев, д.м.

Проф. д-р Цана Бошнакова-Празникова, д.м.н.

Варна

2020

Дисертационният труд е представен в обем 118 страници и съдържа 21 таблици и 31 фигури. Литературната справка включва 246 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за публична официална защита на Катедрен съвет на Катедра „Онкология“ на МУ-Варна на 22.06.2020 г. и съгласно Заповед на Ректора на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна е избрано Научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Красимир Димитров Иванов, д.м.н.

Външни членове:

Проф.д-р Цана Петрова Бошнакова-Празникова, д.м.н.

Проф. д-р Антония Денчева Цоневска-Балчева, д.м.

Проф. д-р Иглика Спасова Михайлова, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Красимир Димитров Иванов, д.м.н.

Доц. д-р Николай Владимиров Цонев, д.м.

Резервен външен член:

Проф. д-р Кирил Василев Драганов, д.м.н.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Валерия Игнатова Калева, д.м.

С благодарности към:

Проф. д-р Красимир Иванов, д.м.н и Медицински Университет – Варна

Доц. д-р Елеонора Димитрова, д.м., научен ръководител,

Д-р Полина Дакова, патолог,

Колегите от отделение по медицинска онкология в Аджибадем СитиКлиник МБАЛ „Токуда“ - София и Клиника по медицинска онкология в УМБАЛ „Света Марина“ – Варна

Семейството ми и приятелите

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 17.09.2020 г. във виртуална класна стая на електронната система Blackboard на Медицински университет – Варна.

Материалите по защитата са на разположение в отдел Докторантско училище на МУ-Варна и на интернет страницата на Медицински университет – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

<i>Използвани съкращения</i>	5
<i>Увод</i>	6
I. МЕТОДИКА НА ПРОУЧВАНЕТО	9
1. <i>Цел и задачи</i>	9
2. <i>Подбор на пациенти</i>	9
2.1. <i>Бази за реализиране на дисертационния труд</i>	9
2.2. <i>Материали и методи</i>	9
2.3. <i>Клинико-морфологична характеристика на изследваните лица</i>	11
3. <i>Специфични методи на изследването</i>	14
3.1. <i>Патоанатомични методи</i>	14
3.2. <i>Методи за статистически анализ</i>	14
II. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО	16
1. <i>Корелации по отношение на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие</i>	16
1.1. <i>Корелации по отношение на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо стадият на болестта</i>	17
1.2. <i>Корелации по отношение на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо развитието на болестта</i>	18
1.3. <i>Корелации по отношение времето на ПБЗ спрямо постигната 3-годишната преживяемост (<36 и >36 месеца)</i>	20
2. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо някои характеристиките на болестта</i>	21
2.1. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо развитието на болестта</i>	21
2.2. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо стадия при диагнозата</i>	22
2.3. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо локализацията на тумора</i> ..	24
2.4. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо възрастта</i>	24
2.5. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо вида оперативна интервенция</i>	25
2.6. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо проведено адювантно лъчелечение (АЛЛ)</i>	26
2.7. <i>Оценка на степента на ТИЛс спрямо имунохистохимичните характеристики (ИХХ) на тумора</i>	27
3. <i>Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и развитието на болестта</i>	27

<i>4. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и вида на получаваното лекарствено лечение</i>	<i>30</i>
<i>5. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и проведено АЛЛ</i>	<i>33</i>
<i>6. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и ИХХ на тумора.....</i>	<i>35</i>
<i>7. Корелация на свободна от болест преживяемост и спрямо ТИЛс и развитието на болестта</i>	<i>36</i>
III. ДИСКУСИЯ.....	38
IV. ИЗВОДИ.....	41
V. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	42
<i>1. Приноси с научно-теоретичен характер</i>	<i>42</i>
<i>2. Приноси с научно-практичен характер.....</i>	<i>42</i>
VI. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА И УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	43

Използвани съкращения

На латиница

CDK –	Cyclin-dependent Kinase
H&E -	Хематоксилин и еозин
PARP –	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
TNM –	Tumor, Node, Metastasis
VEGF –	Vascular Endothelial Growth Factor

На кирилица

АЛЛ –	Адjuвантно лъчелечение
ИХХ –	Имунохистохимичните характеристики
КТ –	Компютърна томография
МРТ –	Магнитнорезонансна томография
ОП –	Обща преживяемост
ПБС –	Преживяемост без събитие
ПЕТ –	Позитрон-емисионна томография
РГ –	Рак на гърдата
СБП –	Свободна от болест преживяемост
СЗО –	Световна здравна организация
ТИЛс –	Тумор-инфилтриращи лимфоцити
ТНРГ –	Тройно-негативен рак на гърдата

Увод

Ракът на гърдата (РГ) е най-честият злокачествен тумор при жените в света. По данни на Световната здравна организация (СЗО) в световен мащаб заболяемостта от РГ е с около 2.1 млн. нови случаи диагностицирани годишно, като в България годишно се регистрират около 4000 нови случаи. В практически план това означава, че в България една от всеки 16 жени има вероятност да се разболее от РГ.

Протичането на болестта и ефекта от лечението зависят много фактори – генетични, и от епигенетични, както и от характеристиката на тумора – хистологичен тип, имунохистохимичен статус на хормонални рецептори и други рецептори по повърхността на туморната клетка, грейд (G), нодален статус и далечно метастазиране. Оценката на всички тези фактори определя правилното терапевтично поведение, като задължително решението при всеки случай на РГ се взема след обсъждане в мултидисциплинарен екип, състоящ се от медицински онколог, лъчетерапевт, клиничен патолог, радиолог и хирург и се основава на правилата на медицина, основана на доказателства.

Ранната диагностиката на рака на гърдата понастоящем е изключително напреднала и широко прилагана, като наред с широко използваните в практиката ултрасонографски и мамографски изследвания на гърдите, все по-често откриването и стадирането на болестта се извършва с компютър-томографски, магнитно-резонансни и хибридни радионуклеидни методи. Тераностичните биомаркери, хистологичният тип на рака на гърдата, както и стадирането по TNM класификацията, определят вида и обема на оперативната интервенция, предшестващото или последващото системно лекарствено лечение и необходимостта от следоперативно лъчение.

Въпреки значителния напредък в диагностиката, все още немалък процент от новите случаи на РГ се откриват в напреднал стадий с наличие на далечно метастазиране, което се отбелязва като неблагоприятен факт. В тези случаи целта на лечението е да забави развитието на болестта, да съхрани качеството на живот и да отложи времето до достигане на палиативно и симптоматично лечение.

При рака на гърдата от десетилетия терапията с цитотоксични препарати е в основата на системното лекарствено лечение. Макар и ефективна по отношение на туморите в голяма част от случаите, химиотерапията уврежда и здравите клетки, което от своя страна определя тежката поносимост и големия брой на нежеланите лекарствени реакции. Затова съществен напредък през последните две десетилетия в лечението на рака на гърдата се отбелязва с навлизането на таргетните терапии. Това са специфични лекарствени препарати, химически субстанции или биологични моноклонални антитела, които притежават много

висока специфичност към определени таргети (мишени), най-често рецептори по повърхността на туморната клетка или сигнални пътища вътреклетъчно или в клетъчното ядро. Свързването на таргетните препарати с техните мишени водят до промени в биологията на туморната клетка, прекъсване на сигналните пътища, от там и на процеса на пролиферация, ангиогенеза и метастазиране и активиране на апоптозата, водещо до настъпване на клетъчна смърт на туморните клетки.

От друга страна, предимство на таргетната терапия е, че високата специфичност на тези препарати към определени характеристики на туморните клетки, предпазва здравите клетки от унищожение, както това се случва при химиотерапията. Едни от първите таргетни препарати в рака на гърдата са хормоналните средства, наричани още ендокринна терапия. Те са насочени към естрогенните и/или прогестеронови рецептори, които разрушават или блокират, като в случаите на хормон-позитивен РГ това води до загиване на туморните клетки. По-съвременните лекарствени препарати с мишенно действие са представителите на тирозин-киназните инхибитори (ТКИ), инхибиторите на васкуларния ендотелиален растежен фактор (VEGF), инхибиторите на ензима поли АДФ рибозе полимераза (PARP), инхибиторите на циклин-зависимите кинази 4 и 6 (CDK4/6) и най-вече анти-HER2-рецепторните моноклонални антитела. Други инхибитори на сигнални пътища, които все още не са напълно проучени и използвани, са mTOR инхибитори, PI3CA-инхибитори, антиандрогени и др.

Наред с таргетната терапия, напоследък в лечението на рака на гърдата навлиза и т.нар. имунотерапия. Съвременните представители на този лекарствен клас, познати още като check-point инхибитори, осигуряват адекватен имуноен отговор към туморните клетки, които иначе имат способността да потискат имунологичните механизми на откриване и елиминиране на туморните клетки. В основата на това ново направление в лечението както на рака на гърдата, така и на редица други видове рак, лежи т.нар. имуноредакционна теория, според която туморогенезът преминава през три фази – на елиминация, на равновесие и избягване.

Отскоро РГ се все повече се разглежда като имуногенен тумор и като такъв отговорът на имунната система срещу раковите клетки е от особена важност за прогнозата и ефекта от лечението.

За да се оптимизира клиничното поведение при рака на гърдата, се търсят прогностични и предиктивни фактори, които да определят съответно протичането на заболяването и за ефекта от лечението. Имуноната система и имунният отговор имат ключова роля при възникването и развитието на рака.

Напоследък се проучва дали степента на пери- и интратуморна лимфоцитна инфилтрация, количествено оценявана чрез тумор-инфилтриращите лимфоцити (ТИЛс), може да служи като прогностичен и предиктивен фактор при рака на гърдата. Към настоящия момент се приема, че степента на лимфоцитна инфилтрация, оценявана само на базата на хематоксилин и еозин (H&E) оцветени туморни участъци предоставят надеждна и статистически потвърдена прогнозна и прогностична стойност при някои субтипове РГ (например ТНРГ и HER2+), поради което на този етап необходимостта от подробна информация за имунните субпопулации на инфилтратата не се свързва с допълнителна информативност за прогнозата на пациента с РГ. По отношение на степента на лимфоцитна инфилтрация, като израз на имуноен отговор, резултатите от някои клинични проучвания доказват, че с нарастване на броя на ТИЛс в тумора и стромата се удължава общата преживяемост (ОП), свободната от болест преживяемост (СБП) и се подобрява клиничният отговор към лечението (например с карбоплатин, трастузумаб и др.). Същевременно наред с публикуваните данни за позитивно влияние на лимфоцитния инфилтрат около тумора, в други клинични проучвания, такава корелация не се установява.

Въпреки значителния напредък в областта на терапевтичното поведение при РГ, все още има нерешени проблеми. Един от тези нерешени проблеми в лечението на рака на гърдата е намирането на надеждни маркери, на които да се основава персонализираният индивидуализиран терапевтичен подход. Това определя необходимостта от проучването на значението на лимфоцитната инфилтрация на тумора и пери-туморната строма за ОП и ефекта от лечение, като по възможност се оформи примерен алгоритъм за оценка на този фактор и се изготвят препоръки за приложението му в клиничната практика.

1. МЕТОДИКА НА ПРОУЧВАНЕТО

1. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи степента на ТИЛс при пациентки с РГ с оглед установяване на прогностичната и предиктивната им стойност и възможността за конкретно приложение в практическата дейност.

За изпълнение на така формулираната цел на дисертационния труд е необходимо да се изпълнят следните задачи:

1. Да се селектират болни с РГ в адювантен и метастатичен стадий
2. Да се определи степента на ТИЛс в туморния материал
3. Да се анализират корелациите между степента на ТИЛс с клиничко-патологичните характеристики на болните с РГ в проучването – възраст, локализация, имунохистохимични характеристики (ИХХ), стадий на заболяването, развитието на болестта, провеждано лекарствено лечение, провеждано адювантно лъчелечение
4. Да се анализира прогностичният потенциал на степента на ТИЛс в зависимост от развитието на болестта и ИХХ.
5. Да се анализира предиктивната стойност на степента на ТИЛс за отговор към провеждана лекарствена противотуморна терапия
6. Да се анализира предиктивната стойност степента на ТИЛс и провеждано адювантно лъчелечение.

2. Подбор на пациенти

2.1. Бази за реализиране на дисертационния труд са две отделения на

„Аджибадем Сити Клиник МБАЛ Токуда“ ЕАД: Отделение по медицинска онкология и отделение по обща и клинична патология

2.2. Материали и методи

Проведено е ретроспективно проучване. Включени са пациентки, които отговарят на включващите критерии и нямат изключващи критерии.

Включващи критерии:

- Възраст над 18 години.
- Пациентки с хистологично верифициран лобуларен или дуктален карцином на гърдата

- Проведено лечение за онкологичното заболяване в адювантен и/или метастатичен аспект
- ECOG PS – пърформанс статус <2.
- Наличие на туморна тъкан от първичния тумор или метастатична лезия за патологично изследване – определяне степента на ТИЛс.

Изключващи критерии:

- Наличие на друга онкологична болест, освен карцином на млечна жлеза
- ECOG PS – пърформанс статус 2 и повече според AJCC.
- Пациентки, които не са провеждали лечение за онкологичното си заболяване.

Проучването е проведено през периода от януари 2019 г. до януари 2020 г. в отделение по медицинска онкология и отделение по клинична патология. Проучени са ретроспективно медицински документи на 118 пациентки, диагностицирани с РГ от 1997 до 2020 г., и след задълбочено проучване за окончателно изследване са подбрани 58 жени с хистологично потвърден лобуларен или дуктален карцином на млечна жлеза в стадии от I до IV според 8^o издание на American Joint Committee on Cancer (AJCC), в пърформанс статус 0, 1 и 2, с изследван имунохистохимично хормоналния статус (ER и PR) и HER2 статус.

Всички пациентки са получили адювантно лечение и/или палиативно лечение за метастазирало заболяване – лекарствено лечение (химиотерапия и/или хормонална терапия) и/или лъчетерапия. По отношение на стадия на болестта пациентките са разделени в 3 групи: адювантни без прогресия, адювантни с прогресия, метастатични при диагнозата.

Параметрите за изследване и проследяване са предварително дефинирани и ретроспективно събирани в рамките на проучването. Използвани са следните методи:

- Анамнеза
- Образна диагностика – компютър-томография (КТ), магнитнорезонансна томография (МРТ), позитрон-емисионна томография с компютърна томография (ПЕТ/КТ) в хода на провежданото лечение
- Туморно блокче от първичния тумор или метастатична лезия за хистологичен анализ: фиксация в неутрален формалин, включване в

парафинови блокчета, стандартно оцветяване с хематоксилин-еозин и оценка на степента на ТИЛс

- Медицинско досие, включващо следната информация:
 - Демографски данни – имена; ID номер / дата на раждане; възраст: под 56 години и над 56 години;
 - медицинската история
 - Пърформанс статус / ECOG: Общото състояние на всеки пациент според ECOG е оценено изходно като 0, 1 или 2.

Информация за онкологичната болест:

- Локализация на първичния тумор
- TNM стадиране,
- Вид и дата на хирургичната интервенция
- Хистологичен резултат: номер, дата
- Имунохистохимична характеристика на тумора
- Дата на започване на адювантната и метастатичната терапия
- Изходни и контролни образни изследвания: КТ, МРТ, ПЕТ/КТ, оценка по RECIST 1.1
- Вид и продължителност на (нео)адювантната терапия
- Вид и продължителност на 1-ва линия терапия
- Провеждане на адювантна лъчетерапия
- Преживяемост без прогресия на болестта
- Обща преживяемост.

2.3. Клинико-морфологична характеристика на изследваните лица

В изследване на ТИЛс взеха участие 58 пациентки с ранен, локално авансирал или метастатичен лобуларен или дуктален инвазивен РГ. Средната възраст на пациентките, включени в проучването е 56 години – Таблица 1. Средна възраст при установяване на диагнозата, като процентно 46.6% от пациентките са на възраст под изчислената средна, а 53.4% – над 56 години, добре разпределени в интервала между минимална възраст от 38 години и максималната 82 г.,

Таблица 2.

Таблица 1. Средна възраст при установяване на диагнозата

Показател	N	Mean	SD	Min	Max
възраст при установяване на диагнозата	58	56,72	10,60	38,00	82,00

Таблица 2. Процентно разпределение на пациентките по възраст спрямо изчислената средна възраст

възраст при диагноза	Брой	%
Под 56 г.	27	46,6
Над 56 г.	31	53,4
Общо	58	100,0

Според стадия на болестта, в проучването са включени пациентки във всеки стадий на болестта (от I до IV), като преобладават тези с II стадий – 41% от пациентките и най-малко са тези в I стадий – 13%, Таблица 3.

Таблица 3. Разпределение на пациентките според стадия на болестта

Стадий	Брой	%
I	8	13,8
II	24	41,4
III	10	17,2
IV	16	27,6
Общо	58	100,0

В зависимост от мястото на възникване на рака на гърдата, при 30 пациентки е бил в лява гърда, в по-малко от участничките вдясно – 28, Таблица 4.

Таблица 4. Разпределение на пациентките според локализацията на РГ

Локализация	Брой/%	Общо
Лява	Брой	30
	%	51,7
Дясна	Брой	28

	%	48,3
--	---	------

Според вида на оперативна интервенция за РГ пациентките са разпределени в 3 групи: на 29 от тях е направена мастектомия, а останалите 16 и 13 пациентки, са с проведени квадрантектomia или биопсия съответно, Таблица 5.

Таблица 5. Разпределение на пациентките според вида на проведената оперативна интервенция

вид операция	Брой	%
мастектомия	29	50,0
квадрантектomia	16	27,6
биопсия	13	22,4
Общо	58	100,0

Според имунохистохимично определения хормонално-рецепторен статус (ER или PR) и свръхекспресия на HER2-рецептора пациентките са разпределени в 4 групи, като преобладават тези с HR-позитивен HER2-негативен статус – 48, и 2, 4 и 4 пациентки с HR+ HER2+, HR-HER2- и HR - HER2+ статус съответно, Таблица 6.

Таблица 6. Разпределение на пациентките според ИХХ на тумора

Имунохистохимична характеристика	Брой	%
HR+ HER2+	2	3,4
HR+ HER2-	48	82,8
HR-HER2-	4	6,9
HR - HER2+	4	6,9
Общо	58	100,0

Според наличието на проведено адювантно лъчелечение пациентките са разделени в две групи – 35 от всички пациентки да проведели такова, а 23 – не, или в процентно изражение 60.3% са провели адювантно лъчелечение срещу 39.7% от пациентките – с непроведено лечение, Таблица 7.

Таблица 7. Разпределение на пациентките според адювантното лъчелечение

Адювантно ЛЛ	Брой	%
Да	35	60,3

Не	23	39,7
Общо	58	100,0

В проучването са включени пациенти с общо състояние 0, 1 и 2, оценено по скалата на ECOG

3. Специфични методи на изследването

3.1. Патоанатомични методи

Тумор-инфилтриращите лимфоцити (ТИЛс) са оценени съобразно методологията от 2014 г. на Международната работна група за оценка на ТИЛс при карцином на гърдата.

При всички случаи са използвани рутинни хистологични препарати, оцветени с хематоксилин и еозин, при микроскопско увеличение 100 и 200. Срезове са с дебелина 5 микрона.

При всички оперативни материали са оценени ТИЛс във всички хистологични препарати (средно три за всяка пациентка), а при core биопсия – в стромата на цялата туморна площ.

Процентът на ТИЛс всъщност е частта от туморната строма инфилтрирана от монуклеарни клетки (лимфоци и плазматични клетки) спрямо общата площ на туморната строма.

Отчетени са ТИЛс само в туморната строма. Изключени са тези, разположени сред туморните клетки, сред голяма централна фиброза или некроза, в зони на карцином *in situ* и в зони *crush* артефакти, както и в съседния на тумора мамарен паренхим.

Материали от първични тумори или метастази, оцветени с хематоксилин-еозин, са изследвани полуквантитативно под микроскоп за перитуморна (стромална) лимфоцитна инфилтрация и са стратифицирани в 4 групи – без инфилтрация, от 1% до 10%, от 10% до 50%, и над 50%.

3.2. Методи за статистически анализ

1. Дескриптивна статистика

- средна аритметична (Mean) – за оценка на централната тенденция;
- стандартно отклонение (SD) – за оценка на разсейването;
- честотни таблици – *абсолютни честоти* – броят на единиците в отделно взета група; *относителни честоти* – броят на единиците в отделно взета група, отнесен към общия брой единици в съвкупността;

2. Хи-квадрат тест (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's Exact Test)

– – при изследване на зависимост между описателни данни с две или повече категории. Тестовете се основават на кръстосана таблица (таблица на спрегнатост).

3. Анализ на Каплан-Майер (Kaplan-Meier Analyze) – за оценка на кривите на преживяемост (кумулятивната преживяемост).

4. Log Rank Test – за сравняване на преживяемостта в отделните групи.

Избраното критично ниво на значимост е $\alpha=0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността (P-value) е по-малка от α . За обработка на данните от проучването е използван специализирания статистически пакет SPSS версия 16.0.

II. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО

В настоящето проучване са проучени данните на 118 жени с РГ за период от януари 2019 г. до януари 2020 г., като беше анализирана РЕТРОСПЕКТИВНО медицинска документация на пациентки, диагностицирани с РГ от 1997 до 2020.

В задълбоченото проучване са включени за изследване 58 жени с хистологично потвърден лобуларен или дуктален карцином на млечна жлеза в стадии от I до IV според 8^о издание на American Joint Committee on Cancer (AJCC), в пърформанс статус 0, 1 и 2, с изследван имунохистохимично хормонален статус (ER и PR) и HER2 статус.

Всички пациентки са получили адювантно лечение и/или палиативно лечение за метастазирало заболяване – лекарствено лечение (химиотерапия и/или хормонална терапия) и/или лъчетерапия. Хистологичните материали от първични тумори или метастази, оцветени по хематоксилин-еозин (H&E), са изследвани полуколичествено под микроскоп за степен на перитуморна (стромална) лимфоцитна инфилтрация и са стратифицирани в 4 групи – без инфилтрация, от 1% до 10%, от 10% до 50% и над 50%. За ниска степен на ТИЛс са приети всички под 50%, докато >50% са приети за висока степен на инфилтрация.

По отношение на стадия на болестта пациентките са разделени в 3 групи: адювантни без прогресия (адювантни+SD), адювантни с прогресия (адювантни+PD) и метастатични при диагнозата.

1. Корелации по отношение на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие

Общата преживяемост (ОП) (от англ. overall survival OS) е дефинирана като времето в месеци от поставяне на диагнозата до настъпване на събитие (смърт) при пациентката.

Времето на преживяемост без събитие (ПБС) (от англ. event-free survival EFS) се дефинира като времето от поставянето на диагнозата до датата, на която пациентката спира да се проследява поради смърт или напускане на проучването. Всички пациентки, при които не е настъпило събитие (смърт), са проследени до януари 2020 г.

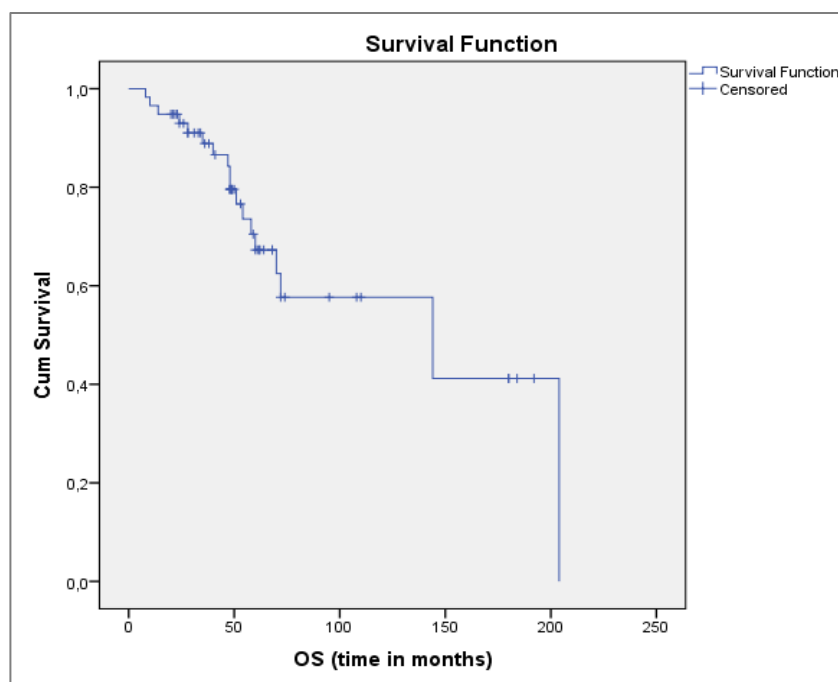
Кривите на преживяемост са оценени по метода на Kaplan-Meier (243) и разликите са оценени чрез log-rank тест (244). Разлика в $p < 0.05$ се счита за статистически значима.

Оценката на прогресията на заболяването е проведена по RECIST 1.1.

Средна ОП

По данни на ГРАО към януари 2020 г. 19 от включените в анализа пациентки са починали. Средната ОП сред пациентките в проучването, при които е настъпило събитие (смърт) е 128 месеца. 9 от тези 19 пациентки за достигнали над 5-годишна преживяемост, 1 от тях беше диагностицирана в метастатичен IV стадий, останалите в I-III стадий. 8 от тези пациентки са определени по ИХХ като луминален, HER2-отрицателен тип, а 9-тата е била HR+/HER2-позитивна. Тези данни съвпадат със световните данни, които сочат, че ОП при не-метастатичните пациентки, получавали адювантна ендокринна терапия, е около 100 месеца (245), Фигура 1.

	Mean	SE	95% CI	
OS (time in months)	128,004	13,75	101,06	154,95



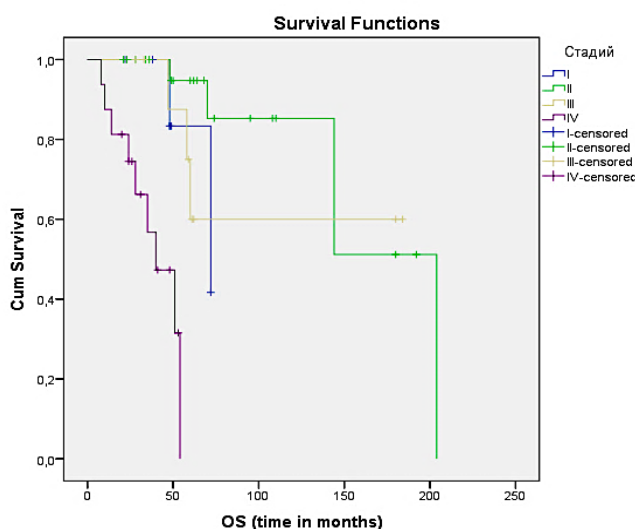
Фигура 1. Kaplan-Meier криви на средна ОП

1.1. Корелации по отношение на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо стадият на болестта

ОП спрямо стадия на болестта при диагнозата – най-висока средна ОП в месеци, се установи в групата пациентки, диагностицирани в стадий II на болестта, като бе изчислена на средно 162.63 месеца. Очаквано най-ниска средната ОП е изчислена при пациентките в стадий IV – средно 38.10 месеца,

което корелира напълно с резултати от други проучвания на ОП при метастатичен РГ (246). Само при 8 от 58 участнички диагнозата е поставена в стадий I, което вероятно обяснява парадоксално изглеждащият резултат за относително по-ниска средна ОП (средно 68.0 месеци) в сравнение с по-напредналите стадии на болестта при поставяне на диагнозата. Резултатите от този анализ показват статистическа значимост с log rank test $p < 0.001$.

	Стадий	Mean	SE	95% CI	
ОП (в месеци)	I	68,00	5,16	57,88	78,12
	II	162,63	18,09	127,18	198,09
	III	132,53	23,34	86,79	178,26
	IV	38,10	4,61	29,06	47,14



Log Rank Test, $p < 0.001$

Фигура 2. Kaplan-Meier криви на ОП и стадият на болестта

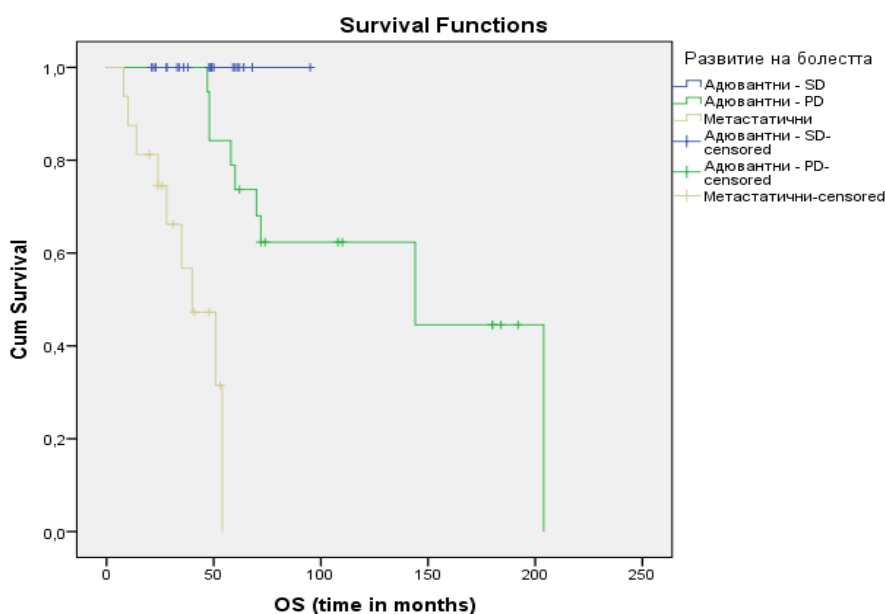
1.2. Корелации по отношение на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо развитието на болестта

По този показател пациентките са разпределени в 3 групи, както следва:

- I. Адювантни (адювантни-SD)
- II. Адювантни → метастатични (адювантни-PD)
- III. Метастатични

При анализа на резултатите на ОП спрямо развитието на болестта – в 3-те групи, статистически достоверно бе установено, че пациентките, при които болестта се е развила изцяло в метастатичен стадий, средната ОП е значително по-кратка, средно 38.10 месеца срещу средно 138.29 месеца при пациентките, при които РГ е метастазирал в хода на адювантния стадий (log rank test $p < 0.001$). Данните за средна ОП в групата пациентки, непрогресирали в хода на адювантното си проследяване, не могат да се изчислят поради липса на починали участнички в тази група към датата на край на проследяването, януари 2020 г.

	Развитие на болестта	Mean	SE	95% CI	
ОП (в месеци)	Адювантни - PD	138,29	16,78	105,39	171,18
	Метастатични	38,10	4,61	29,06	47,14



Log Rank Test, $p < 0.001$

Фигура 3. Kaplan-Meier криви на ОП спрямо развитието на болестта

Средно време на ПБЗ в месеци, изчислено за всички пациентки в трите групи, показва подобни на статистически значимите зависимости при анализа на ОП. Най-дълга е ПБЗ в групата на пациентки, диагностицирани в неметастатичен стадий и прогресирали в хода на болестта средно 108.2 месеца. За сравнение, средното време на ПБЗ при метастатичните пациентки е 31.6 месеца. Макар и относително повече на брой от болните в другите две групи, пациентките в групата адювантни със стабилна болест към момента на спиране на

проследяването (адювантни-SD) показват късо време на ПБЗ – 47.5 месеца, поради факта, че в групата няма нито едно настъпило събитие (смърт), както и краткото време от поставяне на диагнозата до края на проследяване в проучването ни.

Резултатите в групата на адювантни PD могат да се интерпретират във връзка с увеличаване на терапевтичните възможности за лечение на РГ при прогресия на заболяването и свързаното с това удължено време на проследяване.

Таблица 8. Средно време на ПБЗ в месеци спрямо развитието на болестта

Развитие на болестта	N	Mean	SE	95% CI	
Адювантни SD	23	47,52	3,82	39,60	55,45
Адювантни PD	19	108,26	13,03	80,89	135,63
Метастатични	16	31,69	3,77	23,66	39,71

1.3. Корелации по отношение времето на ПБЗ спрямо постигната 3-годишната преживяемост (<36 и >36 месеца)

Ако допълнително разделим пациентките в две групи, под 36 месеца и над 36 месеца на проследяване, се отчита статистически значима разлика с (log rank test $p < 0.001$) по отношение на СБП в трите групи. При пациентките, диагностицирани в метастатичен стадий, 15% от всички пациентки в тази група, достигат и надхвърлят 3-годишен период на проследяване, докато повече от половината от метастатичните пациентки (55.6%) се проследяват без настъпване на събитие по-малко от 36 месеца, което съответства на световните данни.

При болните, диагностицирани в адювантен стадий на болестта, се установиха различия във времето на проследяване в зависимост от това дали са със стабилно заболяване към датата на край на проследяването им, или имат прогресия.

В групата адювантни SD и адювантни PD по-голяма част от болните, 37.5% и 47.5%, са надхвърлили 3-годишния период на проследяване, за сравнение с пациентките с метастатично заболяване с подобно средно време на проследяване, представляващи само 15%. В групата на адювантни PD всички 19 пациентки са се проследявали до събитие или крайна дата повече от 36 месеца, Таблица 9.

Таблица 9. Средно време на проследяване без събитие повече и по-малко от 36 месеца

Развитие на болестта		OS (време в месеци)		Общо	p
		<36	>36		
Адювантни SD	Брой	8	15	23	<0,001
	%	44,4%	37,5%	39,7%	
Адювантни PD	Брой	0	19	19	
	%	0,0%	47,5%	32,8%	
Метастатични	Брой	10	6	16	
	%	55,6%	15,0%	27,6%	
Общо	Брой	18	40	58	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

2. Оценка на степента на ТИЛс спрямо някои характеристиките на болестта

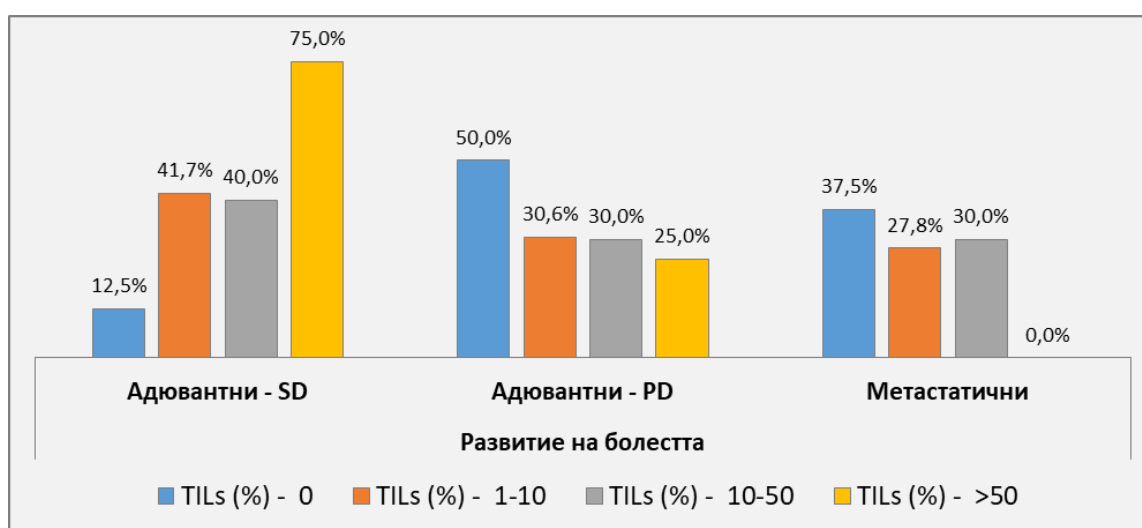
2.1. Оценка на степента на ТИЛс спрямо развитието на болестта

Според процентно измерената степен на стромална лимфоцитна инфилтрация на тумора пациентките бяха разпределени в четири групи, както следва – 0%, 1-10%, 10-50% и >50%. Макар несигнификантно (log rank test $p=0.581$) в групата с метастатични при диагнозата пациентки, всички 16 са с ниска степен на ТИЛс <50%, като отделно най-голям е броят на пациентки в този стадий на болестта със степен на ТИЛс от 1 до 10% – 10 пациентки.

Подобно е и разпределението в групите на адювантните пациентки – 15 при адювантни SD и 11 при адювантни PD. В групата на адювантни SD пациентки 3 са с висока степен на ТИЛс – над 50%, докато в адювантни PD и метастатични техният брой е 1 и 0 съответно, Таблица 10. Поради ограничения брой на пациентки с висока степен на ТИЛс в проучването, не може да се постигне статистическа значимост на този резултат, но литературните данни по темата подкрепят тезата за по-добрия ход и прогноза на пациентките с висок ТИЛс, каквито в нашето проучване са адювантните SD пациентки, Фигура 4.

Таблица 10. Оценка на степента на ТИЛс спрямо развитието на болестта
Fisher's Exact Test

Развитие на болестта		ТИЛс (%)				Общо	p
		0	1-10	10-50	>50		
Адьювантни SD	Брой	1	15	4	3	23	0,581
	%	12,5%	41,7%	40,0%	75,0%	39,7%	
Адьювантни PD	N	4	11	3	1	19	
	%	50,0%	30,6%	30,0%	25,0%	32,8%	
Метастатични	N	3	10	3	0	16	
	%	37,5%	27,8%	30,0%	0,0%	27,6%	
Общо	N	8	36	10	4	58	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	



Фигура 4. Процентно съотношение на ТИЛс спрямо развитието на болестта

2.2. Оценка на степента на ТИЛс спрямо стадия при диагнозата

РГ се стадира по 8-ата ревизия на TNM класификацията, като съответно на размера, нодалния ангажимент и наличието на далечни метастази при диагнозата пациентките се групират в четири стадия от I до IV, като съответно I ст. е без нодален ангажимент и далечни метастази, докато IV е всеки T или N и наличие на далечни метастази.

Четвърти стадий има най-неблагоприятна прогноза и протичане на заболяването. Резултатите в анализа на възможна корелация между степента на ТИЛс и стадия на болестта не установяват статистическа значимост (log rank test $p=0.707$), но определят някои тенденции, описани и в други проучвания.

Високи нива на ТИЛс (>50%) са установени само в групата пациентки, диагностицирани в стадий II на РГ – 4, докато при пациентки в по-напредналите стадии те липсват, липсват и при най-ранния – I стадий.

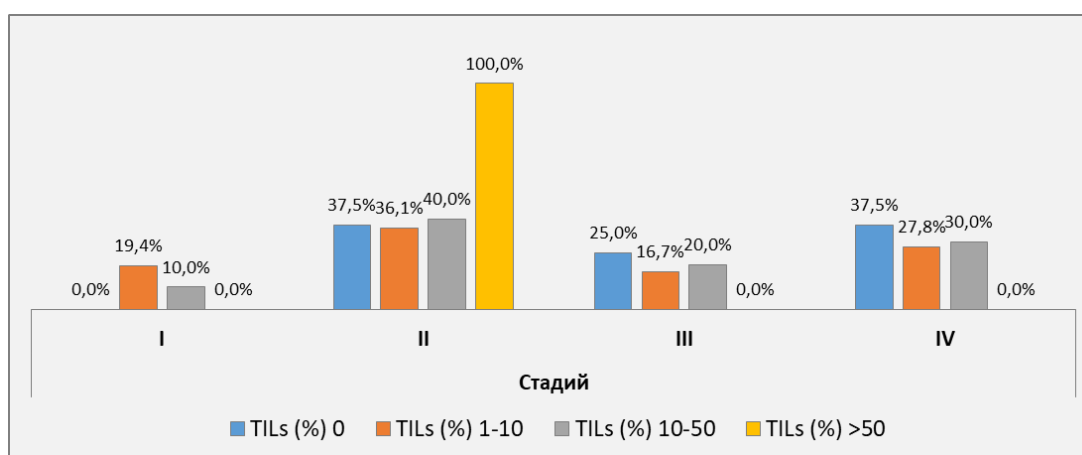
Най-голям е броят на пациентките с ниска степен на ТИЛс от 1 до 10, като с най-голям относителен дял – 36.1% са във II стадий, а 19.4%, 16.7% и 27.8% от пациентките с тази степен на инфилтрация са в I, III и IV стадий, съответно.

Тези резултати се повтарят в групата със степен на ТИЛс от 10 до 50 – 40% от пациентките с тази инфилтрация са във II стадий на болестта, а 10%, 20% и 30% са в I, II и IV стадий, съответно, Таблица 11.

Липсват пациентки, диагностицирани в I стадий на болестта с 0% ТИЛс, докато те са 37.5% от всички пациентки, диагностицирани в метастатичен стадий, както и че най-много от пациентките в IV стадий на болестта не притежават никаква лимфоцитна инфилтрация – 37.5% срещу 0% с над 50% ТИЛс.

Таблица 11. Оценка на степента на ТИЛс спрямо стадия на болестта
Fisher's Exact Test

Стадий		ТИЛс (%)				Общо	p
		0	1-10	10-50	>50		
I	Брой	0	7	1	0	8	0,707
	%	0,0%	19,4%	10,0%	0,0%	13,8%	
II	N	3	13	4	4	24	
	%	37,5%	36,1%	40,0%	100,0%	41,4%	
III	N	2	6	2	0	10	
	%	25,0%	16,7%	20,0%	0,0%	17,2%	
IV	N	3	10	3	0	16	
	%	37,5%	27,8%	30,0%	0,0%	27,6%	
Общо	N	8	36	10	4	58	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	



Фигура 5. Процентното съотношение на ТИЛс спрямо стадия на болестта

2.3. Оценка на степента на ТИЛс спрямо локализацията на тумора

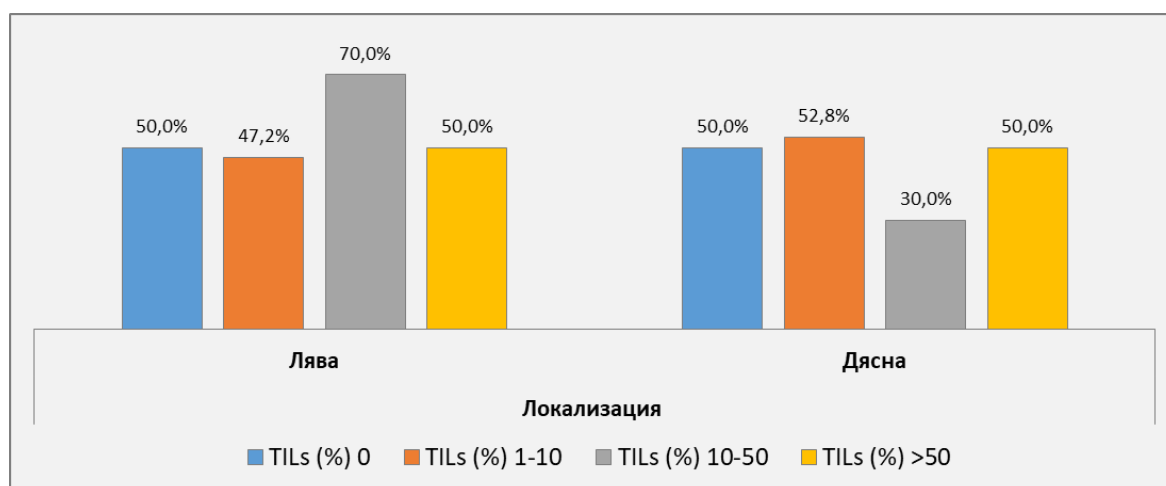
В проучването са установени 30 пациентки с лява локализация на тумора и 28 с дясна локализация, което представлява балансирано разпределение в процентно изражение – 51.7% към 48.3%.

Не се установи статистически значима разлика (log rank test $p=0.667$) между степента на ТИЛс и локализацията на тумора, Таблица 12.

Приблизително еднакво е процентното разпределение в двете групи на РГ с лява и дясна локализация на пациентките със степен на ТИЛс 0%, 1-10% и >50%. Отчетлива разлика се установи при ТИЛс от 10-50% с превес при лява локализация.

Таблица 12. Степен на ТИЛс спрямо локализация (лява или дясна) на РГ
Fisher's Exact Test

Локализация		ТИЛс (%)				Общо	p
		0	1-10	10-50	>50		
Лява	Брой	4	17	7	2	30	0,667
	%	50,0%	47,2%	70,0%	50,0%	51,7%	
Дясна	N	4	19	3	2	28	
	%	50,0%	52,8%	30,0%	50,0%	48,3%	
Общо	N	8	36	10	4	58	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	



Фигура 6. Процентно съотношение на ТИЛс спрямо локализацията на тумора

2.4. Оценка на степента на ТИЛс спрямо възрастта

В проучването средната възраст при диагнозата на пациентките е 56 години. Макар пациентките да са добре балансирани в двете групи, търсената корелация между възрастта и степента на ТИЛс не се потвърди статистически (log rank test

p=0.733). Най-много пациентки, 36, на възраст под, така и над средната, са със степен на ТИЛс 1-10 – 16 срещу 20.

Може да се обобщи, че в групата на възраст над 56 г. с ТИЛс >50% са повече пациентки, отколкото тези със същата степен на инфилтрация, но на по-млада от средната в проучването възраст.

Таблица 13. Степен на ТИЛс спрямо възрастта на включените в проучването Fisher's Exact Test

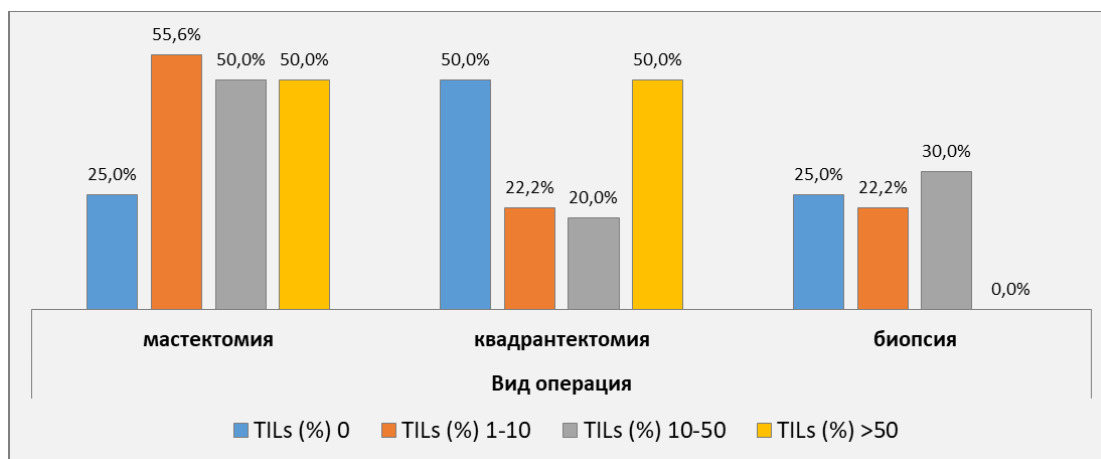
възраст при диагноза		ТИЛс (%)				Общо	p
		0	1-10	10-50	>50		
Под 56	N	4	16	6	1	27	0,733
	%	50,0%	44,4%	60,0%	25,0%	46,6%	
Над 56	N	4	20	4	3	31	
	%	50,0%	55,6%	40,0%	75,0%	53,4%	
Общо	N	8	36	10	4	58	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

2.5. Оценка на степента на ТИЛс спрямо вида оперативна интервенция

Пациентките, включени в проучването, са разпределени в три групи в зависимост от вида на оперативна интервенция, която са провели при диагностициране на заболяването, както следва – мастектомия, квадрантектомия или само биопсия. Няма установена статистически значима разлика (log rank test p=0.538) между трите групи и не може да се потвърди зависимостта между степента на ТИЛс и вида проведената операция.

Според резултатите най-голям брой пациентки във всяка от трите групи са тези с ТИЛс от 1% до 10%, и от 10% до 50%, като данните показваха, че според вида на оперативната интервенция в тези групи преобладава радикалната мастектомия – 55.6% и 50% съответно срещу 22.2% и 20%, провели квадрантектомия. Въпреки отсъствието на статистически значими разлики за проведените оперативни интервенции, се отбелязва тенденция за провеждане на разширена оперативна интервенция при РГ с нарастване на ТИЛс.

От друга страна органосъхраняващата операция е била предпочетена при пациентки, които са имали 0% ТИЛс. Също така прави впечатление, че в групата на пациентките, провели само биопсия, които се предполага, че са диагностицирани в метастатичен стадий на болестта, липсват пациентки с висока степен >50% ТИЛс. Това съвпада с по-горе съобщения резултат от анализа за корелация между ТИЛс и развитие на болестта, Фигура 7.



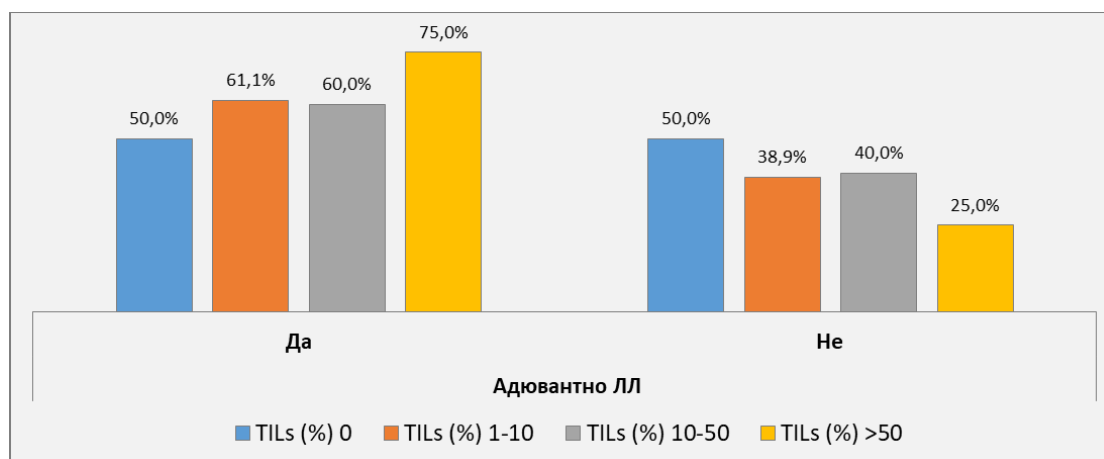
Фигура 7. Процентно съотношение на ТИЛс спрямо вида на оперативна интервенция, $\log \text{rank test } p=0.538$

2.6. Оценка на степента на ТИЛс спрямо проведено адювантно лъчелечение (АЛЛ)

В анализа прави впечатление, че в групата на пациентки, провели АЛЛ, най-голям процент са тези с най-висока степен на ТИЛс (75% срещу 50% за ТИЛс 0%), докато разпределението в групата на непровеждащите АЛЛ преобладават тези с липсващи ТИЛс (50% срещу 25% при ТИЛс >50%).

Резултатите не са статистически значими и поради това не може да се твърди, че съществува корелация между степента на ТИЛс и проведеното АЛЛ. От друга страна, се формира интересна зависимост за преобладаване на пациентки с високи нива на ТИЛс, които са провели АЛЛ ($\log \text{rank test } p=0.914$), Фигура 8.

Fisher's Exact Test

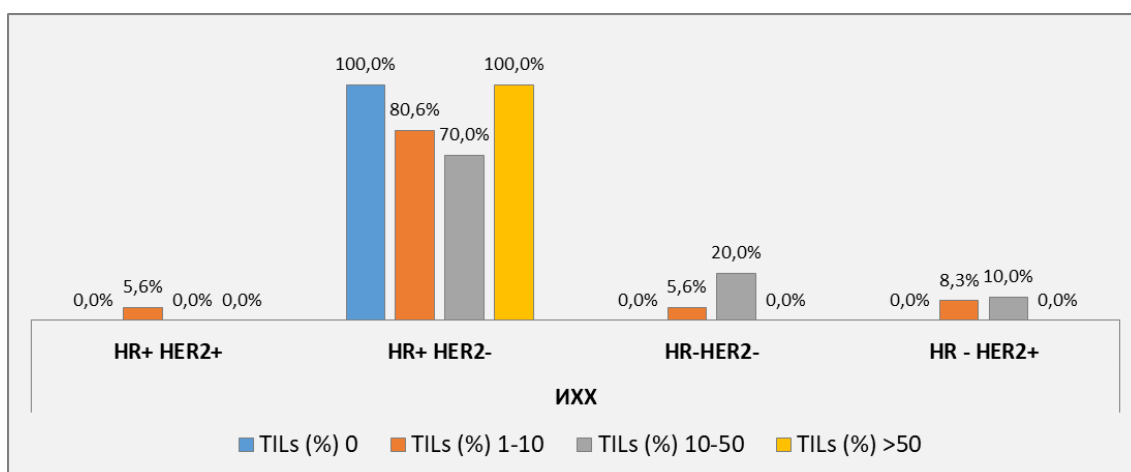


Фигура 8. Процентно съотношение на ТИЛс спрямо проведено АЛЛ, $\log \text{rank test } p=0.914$

2.7. Оценка на степента на ТИЛс спрямо имунохистохимичните характеристики (ИХХ) на тумора

Според определения ИХХ субтип на РГ пациентките в проучването са разделени в четири групи както следва: 1-ва група HR+ HER2+; 2-ра група HR+ HER2-; 3-та група HR- HER2-; 4-а група HR- HER2+. Единствено в групата 2 РГ бяха установени пациентки с високи ТИЛс – 4 пациентки. В същата група единствено бяха намерени и пациентки без ТИЛс – 8.

Подобно на горните анализи и тук най-голям брой пациентки и от четирите групи попадат в групата на ниска от 1 до 10% степен на ТИЛс (log rank test=0.818). Нашите резултати не подкрепят съществуването на корелация между определена ИХХ характеристика на тумора и степента на ТИЛс, Фигура 9.



Фигура 9. Процентно съотношение на ТИЛс спрямо ИХХ, log rank test p=0.818

3. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и развитието на болестта

Резултатите от този анализ не установяват статистически значима корелация между ОП и степента на ТИЛс в различните стадии на протичане на болестта (log rank test p=0.321), Таблица 14.

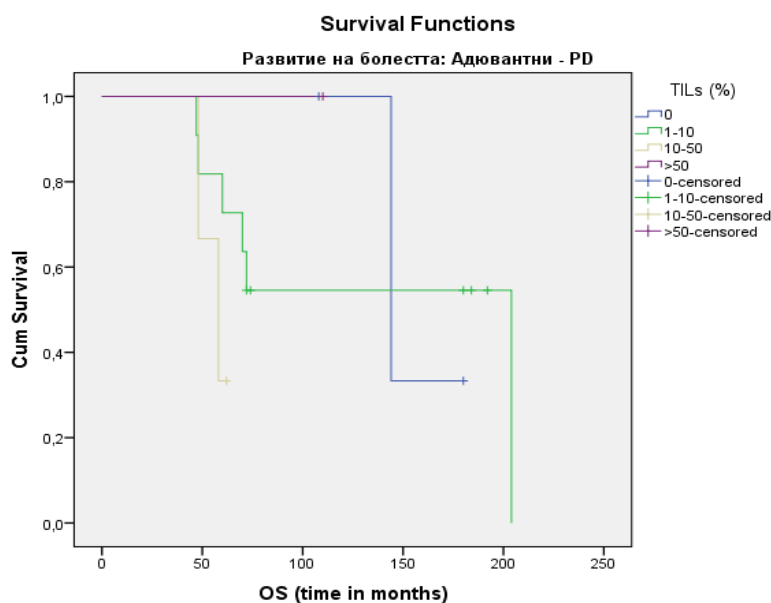
В групата на пациентки, които за времето на проследяване в проучването са без прогресия на заболяването (адювантни SD), ОП не може да се изчисли поради липса на настъпило събитие (смърт). От друга страна, в групата на пациентки, при които е настъпила прогресия в хода на проследяването им (адювантни PD), не бяха описани случаи на ТИЛс над 50%. В тази група се оформи ясна тенденция за увеличаване на ОП с намаляване на ТИЛс, като при 0% ТИЛс средната ОП е 156 месеца, а при 10-50% само 56 месеца, Фигура 10.

Обратно, макар и не толкова добре изразена тенденция се установи и в групата на метастатични пациентки, където при липсващи ТИЛс средната ОП е 26 месеца, а каквато и да е степен на ТИЛс се свързва с удължаване на ОП, Фигура 11. Следва да отбележим, че установената от нас корелация статистически е била подкрепена в проучването CLEOPATRA при HER2-позитивен метастатичен РГ (240).

Таблица 14. Корелация на ОП спрямо ТИЛс в зависимост от развитието на болестта

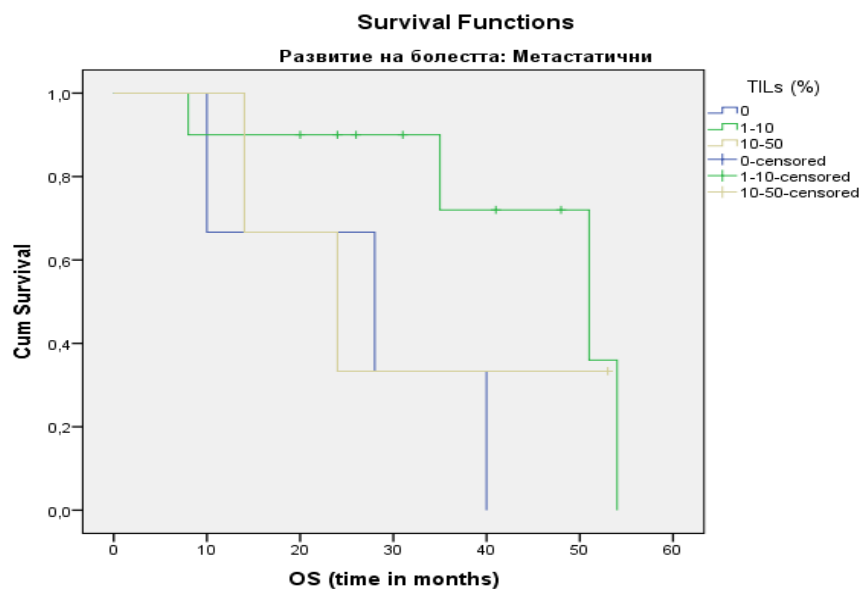
Kaplan-Meier Analyze

Развитие на болестта	ТИЛс	Mean	SE	95% CI	
Адювантни PD	0	156,00	9,80	136,80	175,20
	1-10	138,27	23,90	91,44	185,11
	10-50	56,00	3,40	49,34	62,66
Метастатични	0	26,00	8,72	8,91	43,09
	1-10	44,90	5,62	33,89	55,91
	10-50	30,33	9,55	11,62	49,05



Log Rank Test, p=0.321

Фигура 10. Kaplan-Meier криви на ОП спрямо степента на ТИЛс при адювантни PD пациентки



Log Rank Test, $p=0.156$

Фигура 11. Kaplan-Meier криви на ОП спрямо степента на ТИЛс при метастатични пациентки

В анализа за зависимостите на ПБС от степента на ТИЛс се наблюдава известна корелация с ОП, като за адювантните PD пациентки отново по-ниската степен на ТИЛс се свързва с по-дълго средно време на ПБС, докато при адювантните SD и метастатичните случаи не се установява зависимост или дори тенденция за влияние на лимфоцитната инфилтрация към времето на проследяване, Таблица 15.

Таблица 15. Средно време на ПБС спрямо степента на ТИЛс според развитието на болестта

Развитие на болестта	ТИЛс	N	Mean	SE	95% CI	
Адювантни SD	1-10	15	44,9	4,1	36,0	53,7
	10-50	4	53,5	14,2	8,2	98,8
	>50	3	48,3	12,7	-6,2	102,9
Адювантни PD	0	4	144,0	14,7	97,2	190,8
	1-10	11	109,4	19,5	65,8	152,9
	10-50	3	56,0	4,2	38,1	73,9
Метастатични	0	3	26,0	8,7	-11,5	63,5
	1-10	10	33,8	4,7	23,2	44,4
	10-50	3	30,3	11,7	-20,0	80,7

4. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и вида на получаваното лекарствено лечение

По този фактор пациентките са разделени в 3 групи – 1-ва група с химиотерапия (ХТ)+ендокринна терапия (ЕТ); 2-ра група – само ХТ; 3-та група – само ЕТ, Таблица 16.

Таблица 16. Средна ОП спрямо степен на ТИЛс в зависимост от вида получено лечение

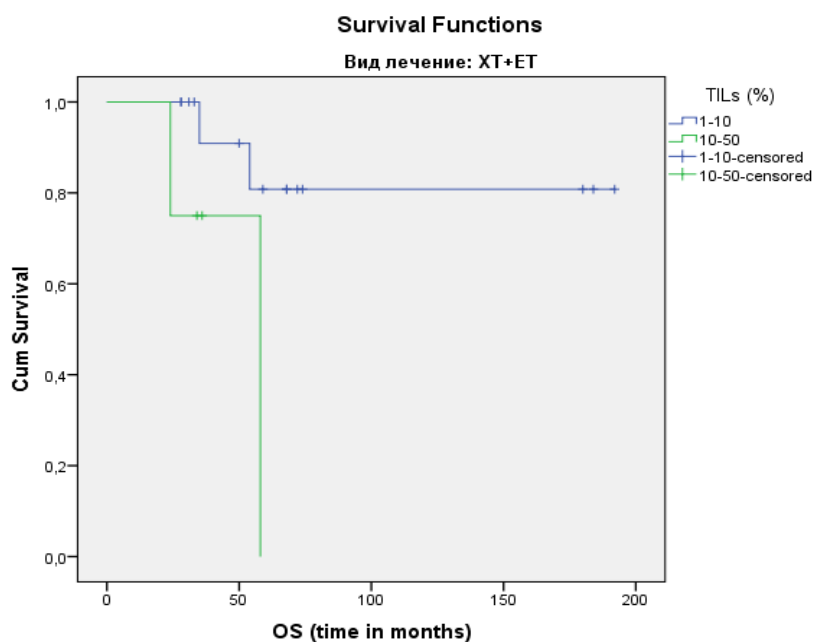
Вид лечение	ТИЛс (%)	Mean	SE	95% CI	
ХТ+ЕТ	1-10	163,79	17,99	128,54	199,04
	10-50	49,50	10,41	29,10	69,90
ХТ	1-10	48,88	6,04	37,03	60,73
	10-50	83,25	10,18	63,31	103,19
ЕТ	1-10	115,33	44,34	28,43	202,23
	10-50	31,50	12,37	7,25	55,75

По отношение на вида приложено лечение – химиотерапия, ендокринна терапия или комбинация от двете, беше установена следната статистически достоверна зависимост:

С намаляване степента на ТИЛс се увеличава ОП, което се наблюдава в случаите, когато пациентките са лекувани с комбинация ХТ+ЕТ, като при 1-10% ТИЛс – продължителността е средно 163.79 месеца (95% CI 128.54-199.04) срещу 49.50 месеца при 10-50% ТИЛс (95% CI 29.10-69.60) ($p=0.041$), Фигура 12. И ЕТ при 1-10% ТИЛс – средна продължителност 115.33 месеца (95% CI 28.43-202.23) срещу 31.5 месеца при 10-50% ТИЛс (95% CI 7.25-55.75) (\log rank test $p=0.001$), Фигура 14.

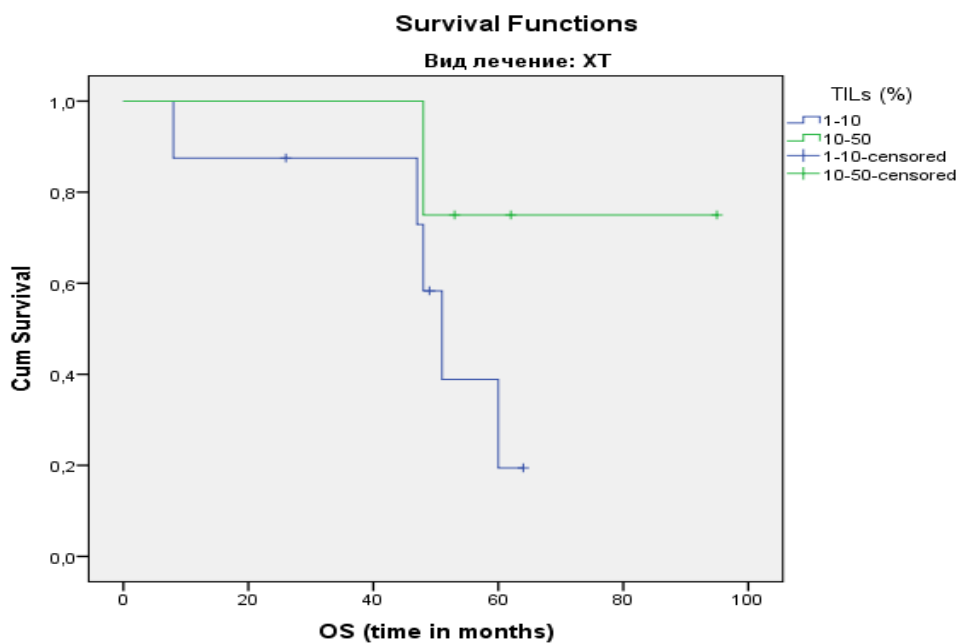
Тези данни се различават от данните на пациентките, лекувани само с ХТ, където с нарастване на ТИЛс се удължава средната ОП – средно 48.8 месеца (95% CI 37.03 – 60.73) срещу 83.2 месеца при 10-50% ТИЛс (95% CI 63.31-103.19), което не е статистически (\log rank test $p=0.169$). Въпреки това можем да отчетем оформянето на трайна тенденция, Фигура 13.

Подобни резултати при пациентки с метастатична болест, лекувани с ХТ, са описани от Fridman et al., Jiménez-Sánchez et al., Galluzzi et al (185,188,206)



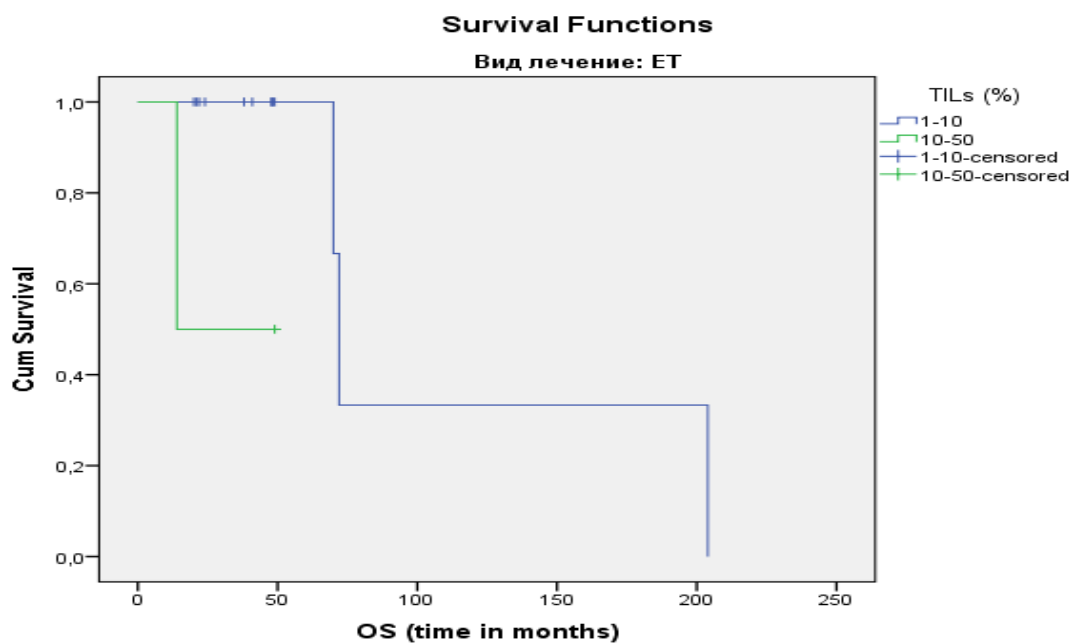
Log Rank Test, $p=0.041$

Фигура 12. Карпан-Мејер криви на ОП спрямо степента на ТИЛс при пациентки, получавали XT+ET



Log Rank Test, $p=0.169$

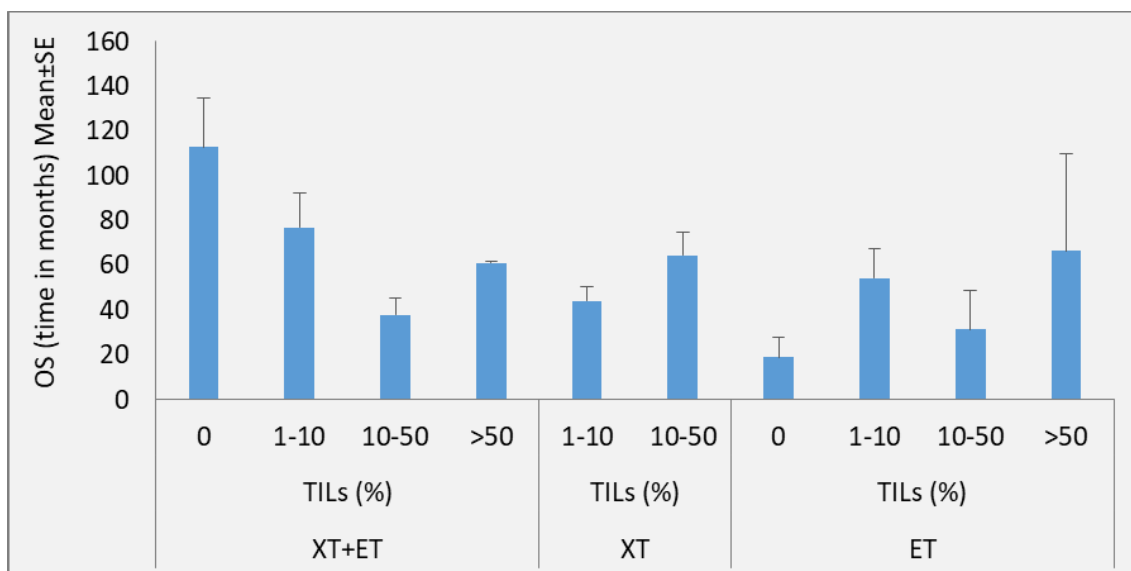
Фигура 13. Карпан-Мејер криви на ОП спрямо степента на ТИЛс при пациентки, получавали XT



Фигура 14. Kaplan-Meier криви на ОП спрямо степента на ТИЛс при пациентки, получавали ЕТ

В анализа за корелация между ПБС и степента на ТИЛс и вида на приложеното лекарствено лечение, макар и само като набелязани тенденции, повтарят статистически значимите корелации между ТИЛс и ОП в групите пациентки, провеждали лечение с ХТ+ЕТ, ХТ или ЕТ самостоятелно. Прави впечатление, че пациентките, получавали само ХТ като противотуморно лечение, са проследявани по-дълго време, когато степента на ТИЛс е била по-висока – средно време на ПБЗ при ТИЛс 1-10% е 44.1 месеца срещу 64.5 месеца в групата с ТИЛс от 10-50%;

Обратно – в групата пациентки, лекувани с ХТ+ЕТ или само с ЕТ, средното време на проследяване е по-кратко в групите с по-висока степен на ТИЛс. Корелацията, наблюдавана при метастатичните пациентки е възможно да се дължи с имуностимулиращата роля на ХТ, която кумулативно заедно с повишените изходни нива на лимфоцитна инфилтрация, удължава времето за проследяване без събитие, Фигура 15.



Фигура 15. Корелация между средното време на ПБС и ТИЛс в групи пациенти, разделени според вида на получаваното лечение

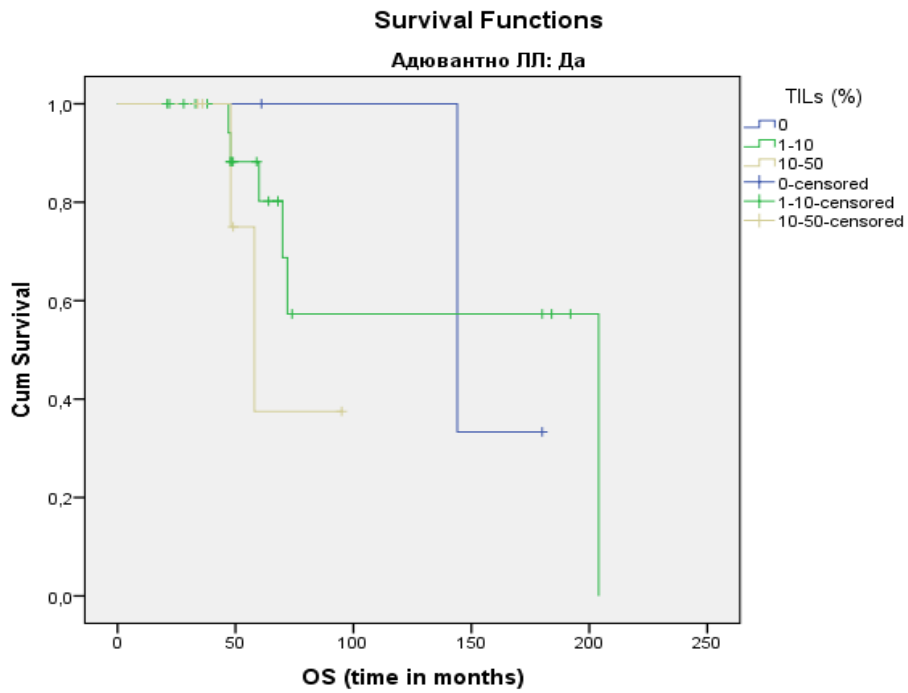
5. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и проведено АЛЛ

Според анамнестичните данни за приложение на АЛЛ за РГ разделихме пациентките в две групи – на провели и непровели АЛЛ. Изследвахме за въздействие върху ОП на степента на ТИЛс в двете групи, Таблица 17.

Таблица 17. Средна ОП и степента на ТИЛс в зависимост от проведено АЛЛ

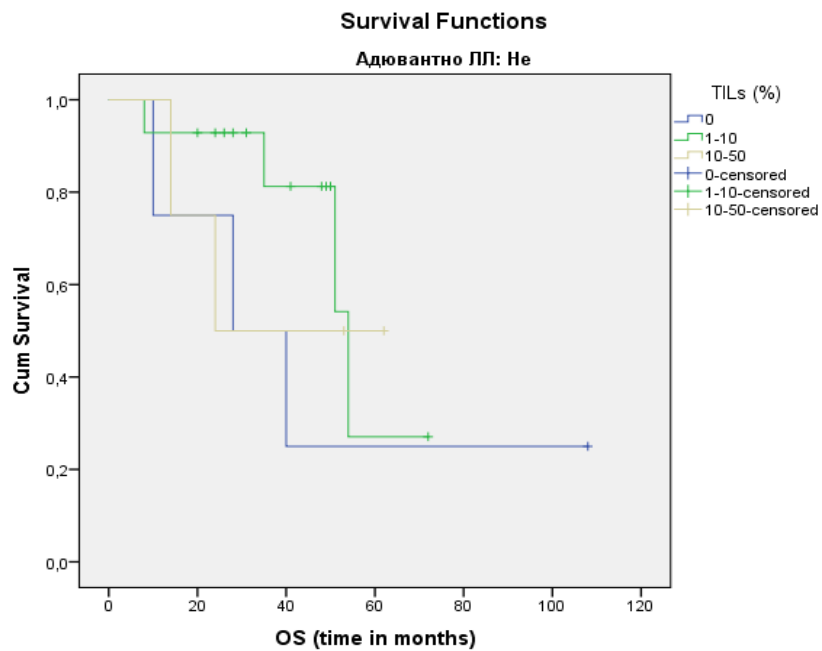
Адjuвантно ЛЛ	ТИЛс (%)	Mean	SE	95% CI	
Да	0	156,00	9,80	136,80	175,20
	1-10	143,56	23,75	97,01	190,10
	10-50	69,38	11,59	46,66	92,09
Не	0	46,50	18,54	10,16	82,84
	1-10	52,57	6,05	40,71	64,43
	10-50	40,50	10,89	19,15	61,85

Установи се, макар и без статистическа значимост, взаимоотношение на ТИЛс и приложеното АЛЛ и тяхното влияние върху ОП. В този анализ се установи, че ОП е обратнопропорционална на степента на ТИЛс при пациентките, които са получили АЛЛ за РГ, но не и при тези, които не са получили такова (log rank test $p=0.407$ и log rank test $p=0.459$), Фигура 16, Фигура 17.



Log Rank Test, $p=0.407$

Фигура 16. Карпан-Мејер криви на ОП при различни степени на ТИЛс при пациентки, проведи АЛЛ



Log Rank Test, $p=0.459$

Фигура 17. Карпан-Мејер криви на ОП при различни степени на ТИЛс при пациентки непроведи АЛЛ

В литературата също няма съобщения за подобна корелация, но ние считаме, че получените резултати могат да дадат основание тази корелация да бъде изследвана в последващи проучвания.

Резултатите в анализа по отношение на показателя средно време на ПБЗ преповтарят тези при ОП, като пациентките с ниски стойности на ТИЛс, провеждали АЛЛ, имат по-дълго време на проследяване – средно 132.2 месеца в групата с 0% инфилтрация срещу 53.3 месеца средно време в групата с 10-50% ТИЛс.

В групата пациентки, непровеждали АЛЛ, няма добре оформена тенденция за зависимост на средното време на ПБЗ и степента на ТИЛс. Това ни дава основание да считаме, че отсъствието на статистическа значимост на тези резултати, не би могло да служи за определяне на необходимостта от провеждане на АЛЛ на данните за т степента на ТИЛс, а трябва да се основава на патоморфологичните и клиничните характеристики на РГ.

Таблица 18. Средното време на ПБЗ и ТИЛс в зависимост от проведено АЛЛ

Адювантно ЛЛ	ТИЛс	N	Mean	SE	95% CI	
Да	0	4	132,25	25,22	51,99	212,51
	1-10	22	76,23	12,19	50,88	101,58
	10-50	6	53,33	9,09	29,96	76,70
Не	0	4	46,50	21,41	-21,63	114,63
	1-10	14	38,36	4,49	28,65	48,07
	10-50	4	38,25	11,45	1,82	74,68

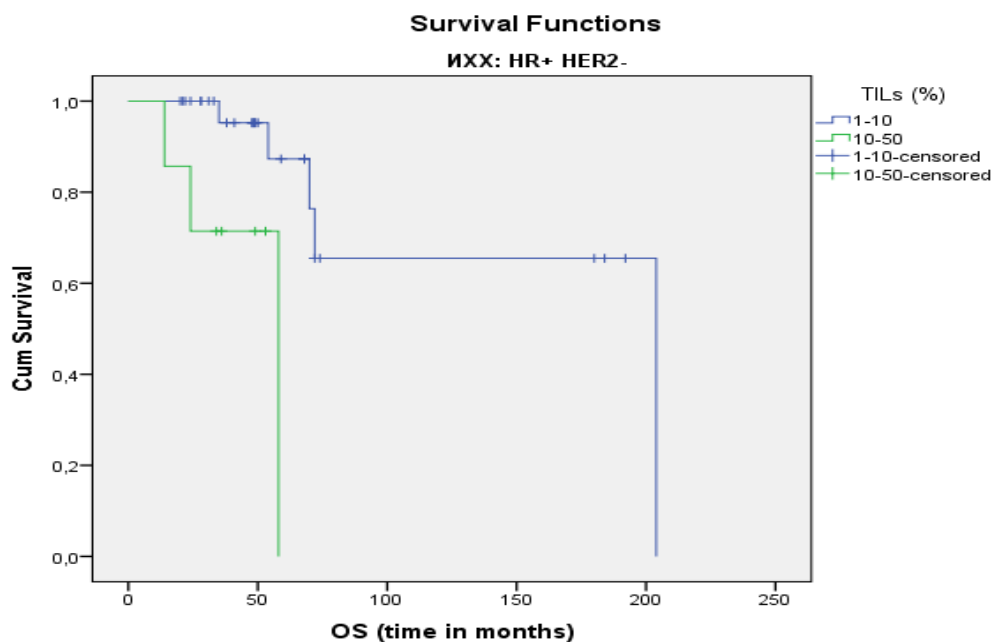
6. Корелация на общата преживяемост и времето на преживяемост без събитие спрямо степента на ТИЛс и ИХХ на тумора

При оценката на ТИЛс спрямо ИХХ характеристиките на тумора в нашето проучване вече беше отбелязана липсата на корелация.

Когато се анализира влиянието върху ОП от степента на ТИЛс при различните ИХХ типове РГ, се установи, че статистическа значимост се установява при резултата за удължена ОП при пациентки с ниска степен на ТИЛс и хормон-рецептор позитивен статус (HR), HER2-негативен.

При 1-10% ТИЛс – средната ОП е 155.02 месеца (95% CI 109.63-200.41) срещу 46.86 месеца при 10-50% ТИЛс (95% CI 30.69-63.03) (log rank test p =0.003). Тази зависимост не се потвърди при HR позитивни/HER2-позитивни и HR-отрицателни/ER2 отрицателни субтипове на РГ. Този анализ дава основание да се приеме, че степента на ТИЛс може да се използва като прогностичен фактор

за удължена преживяемост при HR+/ HER2- типове РГ, като високата степен на ТИЛс 10-50% се счита за неблагоприятен прогностичен фактор.



Log Rank Test, $p=0.003$

Фигура 18. Kaplan-Meier криви на ОП при различни степени на ТИЛс при пациентки с ИХХ тип HR+ HER2-

По отношение на другата крайна точка, заложена в проучването, средно време на ПБС, подобно на ОП, но без да се достигна статистическа сигнификантност на резултатите, се установи подобна зависимост – в групата на пациентки с HR+/ HER2- по ИХХ ниската степен на ТИЛс носи по-голяма полза по отношение на средното време на ПБЗ отколкото високата – 65.8 месеца средно време при ТИЛс 1-10% в сравнение с 38.2 месеца при ТИЛс 10-50%. Не считаме, че можем да си набележим тенденция за зависимост на ПБЗ от ТИЛс при HR позитивни/HER2-позитивни и HR-отрицателни/HER2-отрицателни субтипове на РГ.

7. Корелация на свободна от болест преживяемост и спрямо ТИЛс и развитието на болестта

Макар оценката на свободната от болест преживяемост (СБП) (превод от англ. DFS – disease-free survival) да не е сред задачите на проучването ни, се установиха интересни зависимости в групата на пациентки, които в хода на адювантното си лечение и проследяване, прогресират и преминават в метастатичен стадий на болестта. При общо 18 пациентки, прогресирали на фона

на адювантната си терапия (адювантни-PD), липсваща или ниска степен на ТИЛс е свързана с дълга средната СБП, като при 0% ТИЛс е съответно 106.7 месеца, а при 10-50% е само 30.6 месеца средно.

Таблица 19. Корелация на средната СБП и степента на ТИЛс при пациентки, прогресирали в хода на адювантното си лечение/ проследяване (адювантни PD)

Показател	ТИЛс (%)	N	Mean	Median	SD	Min	Max
СБП в месеци	0	4	106,75	126,00	42,87	43,00	132,00
	1-10	11	76,00	46,00	59,13	12,00	180,00
	10-50	3	30,67	38,00	16,29	12,00	42,00

III. ДИСКУСИЯ

Ракът на гърдата е най-често срещаното злокачествено заболяване при жените, както в България, така и по света, като заболеваемостта, въпреки скрининговите програми в световен мащаб, се увеличава. Поради голямата социална значимост на болестта, както и поради въвеждането на много нови и прицелни лекарствени препарати в лечението на рака на гърдата, търсенето на надеждни прогностични и предиктивни маркери е от особена важност. Установеното от редица автори и резултатите от нашето проучване показват, че изследването на степента на ТИЛс е лесен от техническа гледна точка метод и може да се използва за предиктор на отговор към определени цитотоксични и таргетни терапии.

Ролята на имунната система и имунния отговор към туморите вече е добре проучена при други злокачествени локализации, но отскоро и РГ се причислява към т.нар. имуногенни тумори. Ето защо и степента на туморна лимфоцитна инфилтрация от повече от десетилетие се изследва и анализира, за да се докаже стойността на ТИЛс за предсказване на отговор към лечението и прогресията на рака на гърдата. Ракът на гърдата (РГ) е най-честият злокачествен тумор и най-честата причина за смърт от онкологично заболяване при жените в света. За да се оптимизира клиничното поведение при тази болест, се търсят прогностични и предиктивни фактори, които да определят съответно протичането на заболяването и за ефекта от лечението.

Предиктивен маркер се дефинира като фактор, чието наличие или отсъствие е свързано с чувствителност или резистентност към даден тип лечение, като на базата на изхода от лечението, маркерите са позитивни и негативни. Прогностичните фактори са маркери за хода на болестта в това число и за очакваната преживяемост, като наличието или отсъствието на дадени фактори оказва влияние положително или неблагоприятно въздействие върху пациентите с РГ.

Имунната система и имунният отговор имат ключова роля при възникването и развитието на рака. Напоследък се проучва дали степента на пери- и интратуморна лимфоцитна инфилтрация, количествено оценявана чрез ТИЛс, може да служи като прогностичен и предиктивен фактор при рака на гърдата.

Ракът на гърдата първоначално не се е считал за имуногенен тумор, но данни от предклинични и клинични проучвания наскоро признават „имуния контекст“ и при това заболяване, като характеристиките на туморният имуен субстрат са изследвани като биомаркери за прогноза и мишени за имунотерапевтично лечение

Степента на лимфоцитна инфилтрация оценявана само на базата на хематоксилин и еозин (H&E) оцветени туморни участъци предоставят надеждна и статистически потвърдена прогнозна и прогностична стойност при някои субтипове РГ (ТНРГ и HER2-позитивния), поради което на този етап необходимостта от подробна информация за имунните субпопулации на инфилтратата не се свързва с допълнителна информативност за прогнозата на пациента с РГ

Резултатите от нашето проучване, включващо 58 пациентки с различни по ИХХ и стадии РГ, статистически значимо показаха, че при ниска степен на стромални ТИЛс пациентките, лекувани с ендокринна терапия или последователност от химиотерапия и ендокринна терапия, имат по-голяма полза по отношение на ОП, отколкото тези с висока степен на лимфоцитна инфилтрация.

В групата на пациентки, лекувани само с химиотерапия, установихме, че при по-висока лимфоцитна инфилтрация ОП има тенденция да се удължава.

Това ни дава основание да предположим, че ТИЛс могат да имат надежда прогностична и предиктивна стойност, определящи по-кратка преживяемост и недобър отговор към лечение с ЕТ и/ или ХТ при тези пациентки.

При анализа на пациентките по отношение на ИХХ статус на тумора установихме статистическа зависимост за намалена ОП при нарастване на степента на ТИЛс в групата на HR-позитивни/ HER2-негативни варианти, като ТИЛс са прогностичен фактор за по-кратка преживяемост.

В този случай, може да се заключи, че данните корелират с резултата от анализа за зависимост на ОП от ТИЛс и вида на полученото лечение, ако приемем, че HR-позитивните пациентки са лекувани предимно с ЕТ или в някои случаи с последователна ХТ и ЕТ.

Поради недостатъчна статистическа значимост или наблюдавана тенденция можем да коментираме данните в останалите две групи на HR-позитивни /HER2-позитивни и HR-негативни / HER2-негативни ИХХ варианти.

Интересен факт, несъобщаван досега, е установената нужда, съпроводена с удължена ОП от АЛЛ при пациентки с нисък ТИЛс, независимо от ИХХ типа. Този резултат, независимо че не е потвърден статистически, създава основа за последващо клинично проучване на зависимостта между ТИЛс и необходимостта от АЛЛ.

Необходимо е да се подчертае, че на този етап, въпреки наблюдаваната зависимост в нашето проучване, не бива да се заключава, че липсата или наличието на висока степен на ТИЛс в първичния тумор е основание на

пациентките да не бъде предложено АЛЛ, ако стадият на болестта и видът на оперативната интервенция налагат такова.

По отношение другата крайна точка – средно време на преживяемост без заболяване (ПБЗ), считаме, че прави тази крайна точка удобна за анализ при рака на гърдата, където пациентките нерядко имат дълга ОП и често проследяването им се прекъсва поради липса на контакт с лекуващият ги онколог.

От друга страна, считаме че малкият брой пациентки, голямото разнообразие в избраната група, както и дългата еволюция на болестта при немалък процент от пациентките в анализа не предоставя възможност да се оформят категорични, статистически значими доказателства, че ТИЛс представляват надежден, готов за клинична рутинна употреба прогностичен и предиктивен фактор. Въпреки това считаме установените тенденции за зависимости на ОП и времето на ПБЗ в протичането на болестта от лимфоцитната инфилтрация са интересни и могат да бъдат обект на по-нататъшни проучвания.

IV. ИЗВОДИ

1. Не се установи статистически значима корелация между степента на ТИЛс и развитието на болестта в трите групи: пациентки, провеждащи адювантното си лечение, пациентки, прогресирали на адювантна терапия и метастатични при диагностицирането. И в трите групи преобладава средна степен на ТИЛс - 1-10% (Задача 3).
2. Сигнификантна зависимост между степента на ТИЛс и локализацията на първичния тумор не беше установена (Задача 3),
3. Не се установи прогностичната стойност на степента на ТИЛс в различните групи според развитие на болестта (Задача 4),
4. При анализа на развитието на болестта и степента на ТИЛс се установи тенденция за намаляване на ОП с увеличаване степента на ТИЛс в групата пациентки „адювантни – PD“ (Задача 4),
5. Установи се прогностичната стойност на ТИЛс по отношение на ОП в групата пациентки с ИХХ HR /+/ HER2 /-/, като в тази група ниската степен на ТИЛс е свързана с удължена ОП (Задача 4),
6. Потвърди се предиктивната стойност на ТИЛс по отношение на вида на проведеното лечение – хормонална терапия, хормонална терапия + химиотерапия – намаляването на степента на ТИЛс води до увеличаване ОП в случаите, когато пациентките са лекувани с ХТ+ЕТ или ЕТ (Задача 5),
7. В групата пациентки, лекувани само с химиотерапия, се установи тенденция за удължаване на ОП с нарастване на степента на ТИЛс (Задача 5),
8. Статистически не се доказва предиктивната стойност на степента на ТИЛс спрямо проведено АЛЛ, въпреки, че при пациентки с ниската степен на ТИЛс, провели адювантно лъчелечение, се установи с удължена ОП (Задача 6),
9. Установи се предиктивна стойност на ТИЛс по отношение на СБП като ниската степен на ТИЛс се свързва с удължено време на преживяемост.

V. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Приноси с научно-теоретичен характер

1. За първи път в България се провежда за изследване на зависимостта на ОП и степента на ТИЛс при РГ.
2. От проведените корелационни анализи за първи път в България се докладват данни за връзка между степен на ТИЛс и ОП в зависимост от ИХХ статуса, като статистически се потвърждава прогностичната стойност на ТИЛс при HR+/ HER2-отрицателни пациентки с РГ
3. За първи път в България се докладват статистически значими резултати от анализ, който потвърждава предиктивната стойност на ТИЛс спрямо проведеното лечение с последователното приложение на ХТ и ЕТ или ХТ и ЕТ като самостоятелно приложено лечение за РГ.
4. За първи път се установява тенденция за корелация между степента на ТИЛс и провеждано АЛЛ и въздействието им върху ОП при пациентки с РГ.

2. Приноси с научно-практичен характер

1. Определяне на степента на стромалната тумор-лимфоцитна инфилтрация в първичен туморен материал или от метастаза, оцветен по хематоксилин-еозин, може да бъде обект на допълнителни изследвания с цел потвърждаване на потенциална корелация за отговор към лекарствено и лъчево противотуморно лечение при РГ като предиктивен биомаркер при рака на гърдата.
2. Създаване на предпоставка за разработване на препоръка за ескалация или де-ескалация на химиотерапията или адювантното лъчелечение при рака на гърдата на базата на степента на тумор инфилтриращи лимфоцити.

VI. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА И УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Списък на научните публикации и съобщения във връзка с дисертационния труд

1. Ж.Арабаджиев; Тумор инфилтриращи лимфоцити (ТИЛи) и отговор към лечение с платина при тройно-негативен рак на млечната жлеза (ТНРМЖ). Списание Онкология 43, брой 4, 2015, 11-17

2. Ж.Арабаджиев; Значение на туморната лимфоцитна инфилтрация (ТИЛ) като прогностичен и предиктивен фактор при някои типове ранен и локално авансирал рак на млечната жлеза. Списание на Българското онкологично научно дружество, брой 3/2016, 4-10

3. Ж.Арабаджиев; Значението на ТИЛ като прогностичен и предиктивен фактор при някои типове ранен и локално авансирал рак на млечната жлеза; резюме на доклад, 8ма научна конференция на УСБАЛО “Новости в онкологията-II-ра част”, списание Онкология 1/2018г.

4. Ж.Арабаджиев, Нови терапевтични таргети в лечението на тройно-негативен рак на млечната жлеза. Прогностична и предиктивна стойност на BRCA 1 / 2 мутациите и тумор инфилтриращи лимфоцити (ТИЛи), Списание на Българското онкологично научно дружество, брой 1/2017, 5-11

5. Ж.Арабаджиев, Тумор-инфилтриращите лимфоцити – значението им за протичането и ефекта от лечението при рака на гърдата. Литературен обзор. Medical Magazine, бр 77, 06/2020, 62-67

4. Ж.Арабаджиев, Димитрова-Господинова, Е., Дакова, П., Прогностична и предиктивна стойност на тумор-инфилтриращите лимфоцити. Резултати, Medical Magazine, бр 78, 07/2020, 85-91

Участие в научни форуми с публикувани резюмета

1. Значение на туморната лимфоцитна инфилтрация (ТИЛ) като прогностичен и предиктивен фактор при някои видове ранен и локално авансирал рак на млечната жлеза., 8-ма Национална конференция на УСБАЛО, 15-17 юни 2018г.,